

A juxtaglomeruláris apparátus parakrin szabályozása: Funkcionális és morfológiai összefüggések normál és kóros körülmények között (Rosivall László, 2005-2008, AT 048767)

I. Bevezetés

A juxtaglomeruláris apparátus (JGA) a vesében található alig néhány 100 sejtből álló képlet, melynek morfológiai és funkcionális részletei az orvos-biológiai szakemberek többsége számára is alig ismertek.

Golgi 1889-es fénymikroszkópos vizsgálatokon alapuló leírásával kezdődő és még ma is tartó kutatása során felismerték, hogy e terület részt vesz a vese véráramlás, a glomeruláris hemodinamika, a renin-angiotenzin rendszer és a só- vízürítés szabályozásában. A kutatók sokáig feltételezték, hogy a juxtaglomeruláris apparátus stabil intersticiális milieu-vel rendelkezik ideális közeget biztosítva a glomeruláris filtrációt szabályozó tubuloglomeruláris feedback bonyolult mechanizmusának a macula densától a renin tartalmú granulált sejtekig haladó humorális jelátviteléhez.

A JGA stabil intersticiális folyadék terével kapcsolatban felvetettük, hogy egyszerű morfológiai megfontolások alapján is aligha elképzelhető, hogy a szervecske kúp alakú extraglomeruláris mezangiális terét 3 csőszerű képződmény: az afferens és az efferens arteriola, a disztális tubulus a macula densával úgy zárja le, hogy annak intersticiális folyadéka ne közlekedjék többé-kevésbé szabadon a vese intersticiumával. Különböző kísérleti módszerek felhasználásával igazoltuk, hogy a juxtaglomeruláris apparátus nem zárt egységként viselkedik, hanem jelentős intersticiális folyadékmozgással rendelkezik. Bizonyítékot szolgáltatunk arra is, hogy a nyomás különbségeknek megfelelően folyadék áramlik a juxtaglomeruláris intersticiumba az afferens arteriolából az általunk leírt fenesztrált endothéliumon, a glomerulusból a „mesangialis fá”-n, illetve a vizeletűrből a filtrációs réseken keresztül. E folyadék áramlás morfológiai alapjait nemcsak kísérleti emlőállatokon, de amphiumában, sőt emberben is leírtuk, bizonyítva ezzel a jelenség ősi, általános jellegét.

Megállapítottuk, hogy az afferens arteriola fenesztrált endothél területének kiterjedése függ a renin-angiotenzin rendszer aktivitásától. Ezért az életkor, a stressz és számos farmakológiai beavatkozás alapvetően befolyásolja a fenesztrált endothélium területének nagyságát. Atomerő mikroszkópiával láthatóvá tettük az endothél sejt fenesztrációját, illetve annak változását és kimutattuk, hogy megjelenésük szabályozásában szerepet játszik az angiotenzin, a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) és a MAP kináz rendszer.

Multiphoton lézer mikroszkópiával élő állatban is sikerült kimutatnunk a fenesztrumokat és igazolnunk szerepüket a renin elválasztásban. Azt korábban is tudtuk, hogy az afferens arteriola falában képződő renin egy része az ér lumenébe kerül, de ennek morfológiai alapját nem ismertük, hiszen a renin túl nagy molekula ahhoz, hogy a zárt endothél rétegen keresztül könnyedén átjusson.

A lézer mikroszkópos eljárások in vivo alkalmazásával a glomeruláris dinamika, intersticiális folyadék áramlás és endotheliális permeabilitás korábban nem ismert részleteit és dinamizmusát sikerült feltárnunk, láthatóvá tennünk. Ezek az eredmények felvetik számos olyan alapélettani folyamat újragondolásának és újvizsgálatának szükségességét, mint például a glomeruláris filtráció, intersticiális folyadékmozgás, renin-szekréció stb.

A kifejlesztett in vitro JGA preparátum lehetővé teszi a JGA környezeti befolyásoktól mentes tanulmányozását. A multifoton lézer mikroszkópia alkalmazásával az izolált JGA működését a maga teljes térbeli integritásának megőrzése mellett különböző síkokban vizualizálhatjuk, és így láthatóvá tehetjük a tubuloglomeruláris feedback mechanizmust, illetve különböző fluoreszcens festékek alkalmazásával a renin szekréciót, a folyadékok sejtek közötti áramlását, a filtrációt nagyfelbontású időbeli és térbeli nyomon követéssel. A módszer továbbfejlesztésével élő állatban is képesek voltunk vizualizálni a hemodinamikai történéseket. Megfigyeléseink igazolták korábbi feltevéseinket és újabb provokatív eredményekre vezettek.

Izolált, mikroperfundált JGA modell afferens arteriolájában a magas glukóz koncentráció renin elválasztást és afferens arterioláris vazodilatációt okozott. Ez az endothelium függő magas glukóz koncentrációs hatás NO és prosztaglandin felszabaduláson keresztül érvényesül. Fontos újabb megfigyelés, hogy a citrát-körben keletkező szubcinát a GPR91 receptorokon keresztül emeli a vérnyomást. Ez a receptor megtalálható mind a tubulusokban, mint a juxtaglomeruláris apparatusokban. Ez az eredmény a renin szabályozás metabolikus lehetőségét veti fel és új utakat nyit a hypertonia kutatás területén.

A short loop feedback mechanizmus létezésének bizonyítása emlőállatban mai eszközeinkkel aligha lehetséges, hiszen ehhez ki kellene mutatnunk, hogy ha az afferens arteriolában változtatjuk például a kolloid ozmotikus nyomást, akkor ennek hatására - szinte azonnal - változik a glomeruláris kapilláris ellenállás. Azonban ha változtatjuk a kolloid ozmotikus nyomást az afferens arteriolában, úgy következményként az efferens arteriola kolloid ozmotikus nyomása is változik, illetve az ugyanazt a nephront körülvevő peritubuláris kapillárisokban is változnak a nyomás viszonyok. Ráadásul ismert, hogy a nephron körüli intersticiális ozmotikus nyomás befolyásolja a klasszikus tubuloglomeruláris feedback érzékenységet. Ezért kísérleti emlőállatban nem lehet eldönteni, hogy a létrejött glomeruláris kapilláris ellenállás változás kialakulásának mi a mechanizmusa. Létezik azonban egy olyan állat, az amphiuma, amelyről korábban bizonyították, hogy rendelkezik a klasszikus feedback mechanizmussal, ugyanakkor az efferens arteriola nem ad kapillárist a szülői nephron köré, hanem közvetlenül torkollik a vénás rendszerbe. Ezen állaton sikerült kimutatnunk, hogy az afferens arteriolában történő ozmotikus koncentrációváltozás reverzibilis módon megváltoztatja a glomeruláris ellenállást. Ezzel bizonyítottuk, hogy amphiumában működik a short loop tubuloglomeruláris vagy feed forward mechanizmus. Hogy ez emlősben/emberben is így működik, arra csak a morfológiai azonosságok/hasonlóságok utalnak, de a bizonyítás még várat magára.

II. A fenesztráció/endotheliális nanocsatorna kimutatása atomerő mikroszkópiával sejtenyészetben

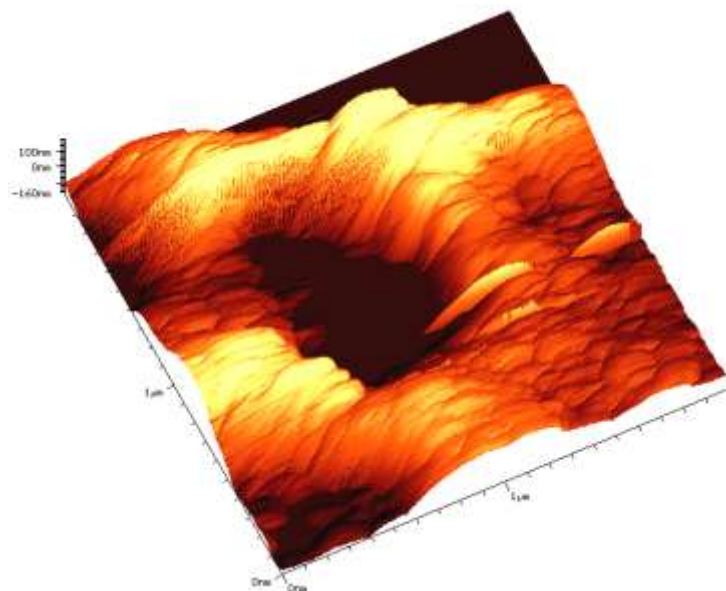
Az atomerő mikroszkópia (AFM) új lehetőség arra, hogy nanométeres tartományban is részletgazdag és igen jó minőségű képet nyerjünk különböző felszínekről így például a sejtmembránról. AFM-os vizsgálatok megerősítették korábbi EM vizsgálatokkal nyert eredményeinket a méretről, az elhelyezkedésről és a fenesztrátumok számának változásáról.

Human umbilikális véna primer endotheliális sejtenyészetében a fenesztrumok mérete AFM módszerrel mérve ugyanabba a tartományba esett, mint amit a fenesztráció eredeti leírásakor in vitro az afferens arteriolában elektron mikroszkóppal láttunk. Az eredeti tanulmányban azonban nem volt mód arra, hogy a limitált számban tanulmányozható fenesztra alapján az

átmérő nagyságáról részletes információhoz jussunk. AFM vizsgálataink alapján a kezeletlen, nyugvó és etanolban szárított HUVEC felszínen $8 \times 8 \mu\text{m}$ -es felületen átlagban $12,1 \pm 2,5$ fenesztrátum található. Az AFM lehetővé tette, hogy meghatározzuk az átmérő mérete szerinti eloszlást. Kiderült, hogy a fenesztrátumok 90%-a 200 nm-nél kisebb átmérőjű és a 400-500 nm-es nyílások csak elvétve fordultak elő. Számításaink szerint ebben a preparátumban az endothél sejtek felületének kb. 0,2%-át fedi fenesztra. Elgondolkasztó, hogy a szájadékok borította összes felületben a nagyobb átmérőjű nyílások, még az igen alacsony számuk ellenére is jelentősen közrejátszanak. Hogy vajon ennek van-e bármiféle funkcionális jelentősége, azt további vizsgálatoknak kell kideríteniük.

Az AFM azt is lehetővé tette, hogy a fenesztrációt ne mind síkbeli képződményt vizsgáljuk, hanem a valóságnak megfelelően, mint nanocsatornákat tanulmányozzuk. Az endotheliális nanocsatornák nagy nagyítással jellegzetes formát mutatnak. A felszínen felhányt széllel körülvéve ovális vagy körhöz közelálló bejárat általában szabálytalan formájú. A csatornák mélyebb rétegekbe történő követésével kiderült, hogy a csatornák tölcser formájúak.

Technikai okok miatt a csatorna csak mintegy 150-170 nm mélységig volt nyomon követhető, tehát a túlsó szájadék nem volt tanulmányozható.



1. ábra. Egy fenesztrátum AFM-el készített sejtfelszíni képe nagy felbontásban, $2 \times 2 \mu\text{m}$ -es felületen.

Átmérő 100 nm mélységben	0-500	0-100	101-200	201-300	301-400	401-500
A csatornák átlagos száma	$12,1 \pm 2,5$	$8,6 \pm 1,6$	$3,10 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,0$

1. táblázat.
Különböző átmérőjű fenesztrátumok előfordulása $8 \times 8 \mu\text{m}$ -nyi sejtfelületen, etanollal szárított mintákon.

Mélység (nm)	Átlagos átmérő (nm)			
	0°	45°	90°	135°
-50	446±35	403±63	389±47	411±39
-60	398±32	356±56	351±29	353±27
-70	351±36	317±49	305±37	327±21
-80	297±39	269±40	269±41	290±21
-90	246±36	224±39	217±28	249±32
-100	211±41	193±31	182±30	217±34
-110	174±45	159±34	145±35	177±39
-120	168±47	127±37	130±37	166±37

2. táblázat. Fenesztrátumok átmérőjének változása különböző mélységekben és különböző síkok mentén számolva, etanollal szárított mintákon.

Az endothél sejtfelszínt nem csupán dehidrált sejteken vizsgáltuk, hanem élő sejteken is. Folyadék fázisban a kezeletlen sejtfelszín morfológiájában nem találtunk eltérést, a fenesztrátumok átmérő szerinti eloszlása nem mutatott eltérést.

	A fenesztrátumok átmérő szerinti eloszlása (%)				
	<100 nm	101-200 nm	201-300 nm	301-400 nm	401-500 nm
Élő sejtfelszín	0,71	0,18	0,08	0,03	0,00
Etanolban szárított	0,67	0,19	0,08	0,05	0,02

3. táblázat. Különböző átmérőjű fenesztrátumok előfordulása 8x8 µm-nyi sejtfelületen etanolban szárított illetve élő sejteken.

III. A fenesztráció kialakulásának szabályozása

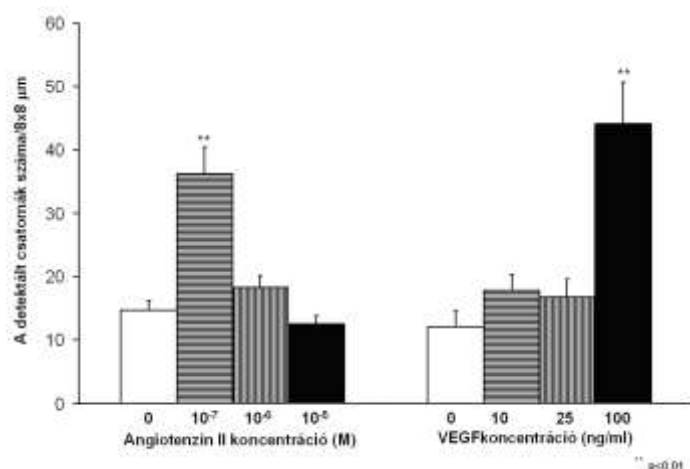
Fenesztrált endothélium a szervezetben csak speciális helyeken, mint például a glomerulusban található. A fenesztráció jelenléte az afferens arteriola disztális szakaszán még ennél is különösebb, mert nemcsak egy magasnyomású (50-60 Hgmm) érszakaszról, de ráadásul még egy ősi, már az amphiumában is jelenlévő képződményről van szó. A fenesztráció jelentős élettani szabályozási mechanizmusok morfológiai alapja, ezért a kialakulás szabályozásának megismerése fontos. Más szövetekre vonatkozólag korábban már feltételezték, hogy a permabilitást fokozó vaszkuláris növekedési faktor szereplője lehet a mechanizmusnak. A VEGF bár a szervezetben általában alacsony expressziót mutat, a vesében a glomeruláris podocitákban, a disztális tubulusokban és az erek simaizomzatában erősen expresszáldott. A VEGF részt vesz a periodontális keringés szabályozásában is. A gingivában található erek endothél sejteinek felszínén megtalálható a VEGFR-2 receptor.

Mindezek alapján feltételezve, hogy a VEGF regulátora az afferens arteriola endotheliális nanocsatornák megjelenésének, tanulmányoztuk in vitro primer endothélsejt kultúra modellen a VEGF hatását a csatornácskák kialakulására, illetve a konfluens sejtréteg permeabilitására. A VEGF transzmembrán tirozinkináz receptorai közül a 2-es receptort aktivitásának szerepét vizsgáltuk.

A VEGF expresszióját számos a JGA-val kapcsolatos szabályozó anyag befolyásolja. Az angiotenzin II fokozhatja a VEGF elválasztást. A VEGF aktiválja a p38 MAPK kinázt.

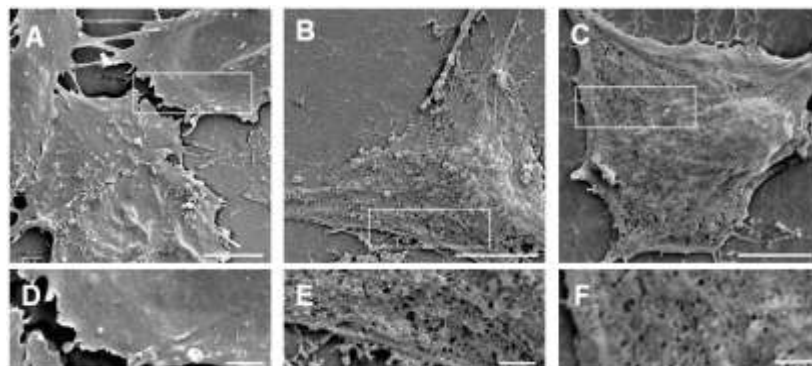
A 48 órás VEGF és Ang II kezelés megnövelte a fenesztrációt és az endotheliális permeabilitást. A vizsgálat során a sejteket üveg fedőlemezen konfluens állapotig

növesztettük, majd kezeltük különböző dózisú Ang II-el és VEGF-el. A vizsgálatok 8x8 µm-es sejtfelületen történtek és azokat a sejtfelületi bemélyedéseket tekintettük fenesztrátumoknak, amelyek mélysége elérte vagy meghaladta 100 nm-ert. Vizsgálataik alapján 48 óra után a 100 ng/ml VEGF közel négyszeresére, míg a 10^{-7} M Ang II közel a duplájára növelte a fenesztrátumok számát. Ezt a megfigyelést scanning elektronmikroszkóppal (SEM) is megerősítettük. A rövid távú VEGF és Ang II kezelések nem okoztak eltérést a fenesztrátumok számában.



2. ábra. A
fenesztrátumok számának változása 48 órán keresztül tartó VEGF és Ang II kezelések hatására.

A SEM technikával készített képeken látható, hogy a 10^{-7} M Ang II és 100 ng/ml VEGF kezelések hatására az endothél felszínén lyukak jelentek meg.



3. ábra. A
fenesztrátumok számának változása 48 órán keresztül tartó VEGF és Ang II kezelések hatására. Az A, B, C képeken a feltüntetett lépték 10 µm, a D, E, F képeken 2 µm.

AFM-el megvizsgáltuk, hogyan változik az endothél sejtfelület morfológiája Ang II és VEGF kezelést követően élő, nem szárított sejteken. Az élő sejteken végzett mérésekben a 48 órás Ang II kezelés kétszeresére, míg a VEGF kezelés háromszorosára növelte a fenesztrátumok számát és ugyanakkor eltérést tapasztaltunk a fenesztrátumok átmérőjében is, mivel mindkét kezelés hatására megnőtt a fenesztrátumok átmérője és így az átmérő szerinti eloszlása is. A folyadék fázisban, élő sejteken végzett vizsgálatok alapján a kezelések nem csupán a fenesztrátumok számát, hanem azok átmérőjét is megnövelték.

	Fenesztrátumok száma	Átmérő (nm)
Kontroll	5,7 ± 1,3	77,3 ± 1,6
10 ⁻⁷ M Ang II	11,3 ± 1,5	119,5 ± 14,9
100 ng/ml VEGF	20,9 ± 1,3	125,9 ± 9,4

4. táblázat.

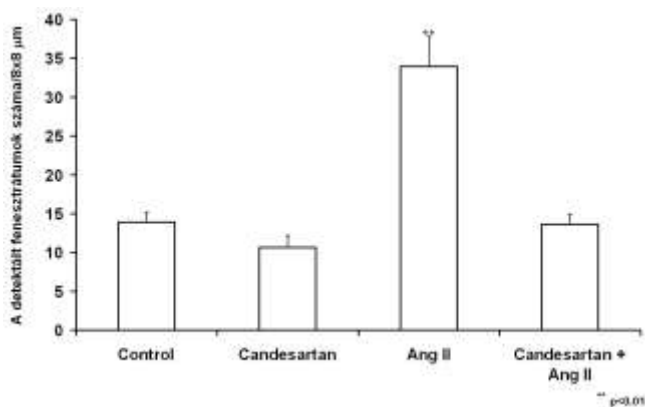
Fenesztrátumok számának és átmérőjének változása Ang II és VEGF kezelések után élő sejteken.

	A fenesztrátumok átmérő szerinti eloszlása (%)					
	<100 nm	101-200 nm	201-300 nm	301-400 nm	401-500 nm	
Élő sejtfelszín	0,71	0,18	0,08	0,03	0,00	Kontroll
Etanolban szárított	0,67	0,19	0,08	0,05	0,02	
Élő sejtfelszín	0,54	0,23	0,11	0,06	0,06	10 ⁻⁷ M Ang II
Etanolban szárított	0,78	0,13	0,04	0,03	0,02	
Élő sejtfelszín	0,60	0,17	0,09	0,09	0,05	100 ng/ml VEGF
Etanolban szárított	0,79	0,10	0,06	0,03	0,02	

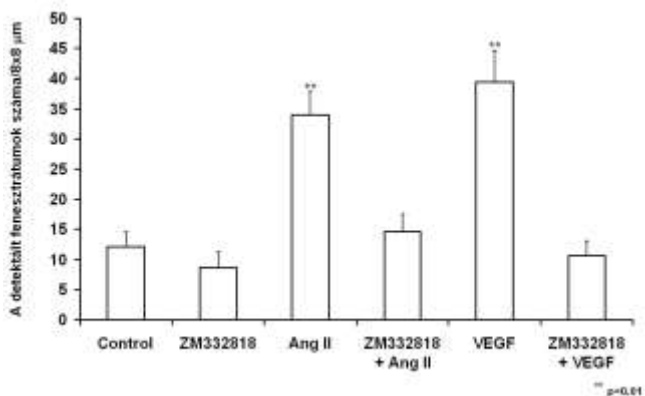
5. táblázat.

Különböző átmérőjű fenesztrátumok előfordulása VEGF és Ang II kezelések után sejtfelületen etanolban szárított illetve élő sejteken.

Az Ang II és a VEGF a fenesztrációt fokozó hatását AT₁ és VEGFR-2 aktivációján keresztül hozta létre. Specifikus receptor blokkolók felhasználásával megvizsgáltuk az AT₁ illetve a VEGFR-2 receptorok szerepét a fenesztráció kialakulásában. Az AT₁ receptort 10⁻⁵ M candesartan-al, míg a VEGFR-2-t 50 nM ZM323881-el blokkoltuk. Eredményeink alapján az AT₁ aktivációja felelős az Ang II hatásaiért, míg a VEGF a VEGFR-2 aktivációján keresztül fejt ki hatását, továbbá a VEGFR-2 aktivációja befolyásolhatja az Ang II fenesztráló hatását is, de az ezért felelős mechanizmusra egyelőre nincs magyarázatunk.

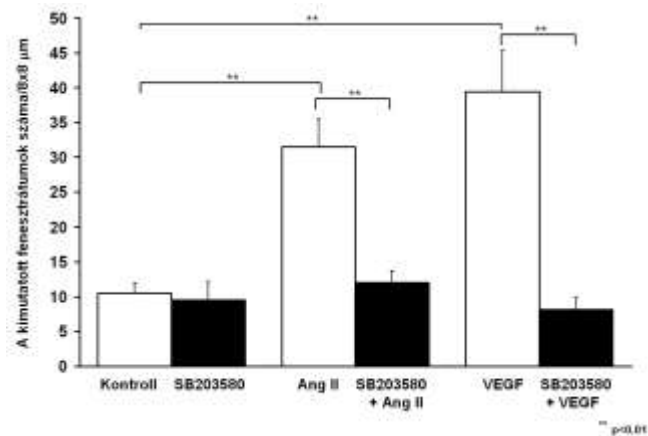


4. ábra. Az AT₁ receptort blokkoló candesartan előkezelés hatása az Ang II által megnövelt fenesztrációra.



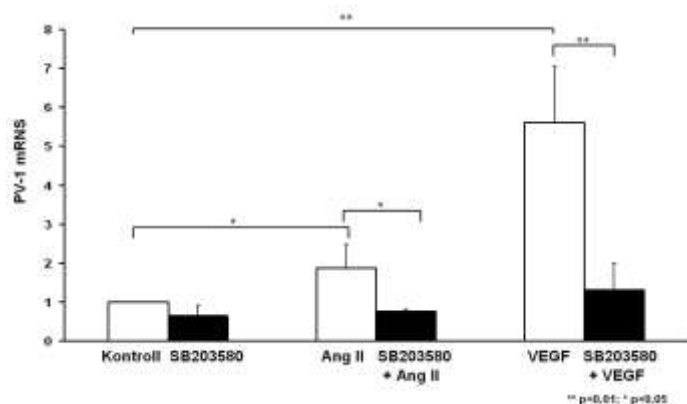
5. ábra. A VEGFR-2 receptort blokkoló ZM323881 előkezelés hatása a VEGF és Ang II által megnövelt fenesztrációra.

A p38 aktivációja szerepet játszik a VEGF és Ang II kezelést követő fenesztráció fokozódásban. A p38 MAP kináz aktivációját gátló SB203580 előkezeléssel vizsgáltuk a kináz szerepét a fenesztráció kialakulásában. Eredményeink szerint a p38 gátlása során elmaradt a VEGF és Ang II kezelést követő fenesztráció növekedés.



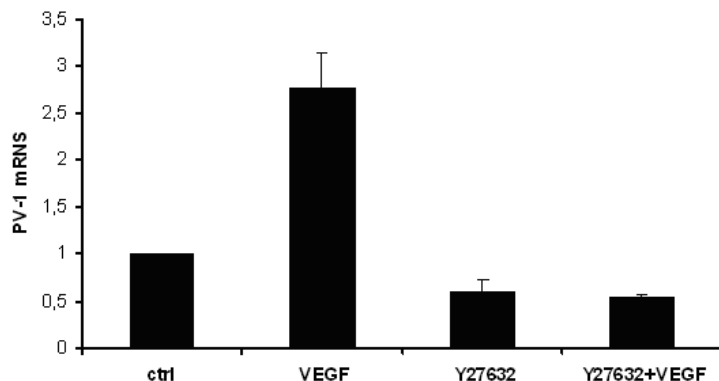
6. ábra. Az p38 MAP kináz gátlás hatása az Ang II és VEGF által megnövelt fenesztrációra.

A 48 órás VEGF és Ang II kezelés fokozta a fenesztrátum asszociált PV-1 molekula mRNS szintjét. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a fenesztrátum-asszociált PV-1 molekula mRNS szintjére milyen hatással van a 48 órás VEGF és Ang II kezelés, továbbá SB203580 gátlószerrel vizsgáltuk a p38 MAP kináz szerepét a folyamatban. Kvantitatív real-time PCR-el kimutattuk, hogy mindkét kezelés megnöveli a PV-1 mRNS szintjét és ez a fokozódás a VEGF esetében erőteljesebb és továbbá azt is igazoltuk, hogy a PV-1 mRNS szintjének növekedése nagyban függ a p38 MAP kináz aktivációjától.



7. ábra. A VEGF és az Ang II kezelés hatása a fenesztrátum-asszociált PV-1 molekula mRNS szintjére. A p38 aktivációjának szerepe a folyamatban.

A VEGF esetében a ROCK (Rho aktivált kináz) útvonal is szabályozó szerepet játszik a PV-1 expressziójában. A PV-1 mRNS szintjének real-time PCR-es meghatározásával megvizsgáltuk a ROCK szerepét a PV-1 expressziójában. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a ROCK kináznak szerepe van a VEGF kezelést követő PV-1 expresszió fokozódásban, mivel gátlása csökkentette a VEGF hatását.



8. ábra. A ROCK gátlása kivédte a VEGF kezelést követő PV-1 mRNS szint növekedést.

IV. Endotheliális fenesztráció kimutatása/láthatóvá tétele élő állat afferens arteriolájában multiphoton lézer mikroszkópiával

Felhasználva a multiphoton lézermikroszkópia azon tulajdonságát, hogy a lézersugárral a felszín alatt 200-300 μm -ig fókuszálhatók, tehát optikai metszési síkokat lehet vizualizálni, vizsgáltuk a fenesztráció morfológiáját, illetve funkcióját élő állat intakt nephronjában.

Patkányban a vesét oldalt készített gomblyukmetszéssel keresztül előbuktattuk és a vese felszínét multifoton lézer mikroszkóppal vizsgáltuk. A renint szupravitalisan quinakrinnal, az endothélt lucifer-sárgával (LS), a plazmát 70kDa dextran-rodamin B-vel jelöltük. Megfelelő hullámhosszú lézer fény hatására a fluoreszkáló festékek láthatóvá tették a keringő vörösvértesteket, a renin granulumokat, és az endothél szerkezetét München-Wistar patkányokban, ahol a vese felszínén is található glomerulusok. Egérben éles metszéssel eltávolítottuk a bab alakú vese gerincének mintegy 0,5 mm-es rétegét. Így a vérzéscsillapodás után a felszínre került glomerulusokat ugyancsak képesek voltunk tanulmányozni. A festékek beadása után az afferens arteriola sárgán festődő endothél fala éles vonalként látszott a proximális renin-negatív érszakaszon. Ahol azonban az afferens arteriola fala külső és belső felszíne körül megjelentek a renin-granulumok, az éles sárga csík elmosódottá vált. Nagyobb nagyítással jól látszott, hogy az elmosódottság a lyukacsos/fenesztrált szerkezetnek volt köszönhető. Az élő állatban végzett mérések ismét szoros korrelációt mutattak a renin-pozitív és a fenesztrált endothéllal rendelkező érszakaszok hosszai között. A fenesztráció, illetve az ugyancsak jól látható renin granulumok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése helyenként figyelemreméltóan mutatta az elképzelésünk realitását azaz, azt, hogy a renin granulumok az általunk leírt endotheliális csatornán keresztül kerülhetnek a keringésbe.

V. Fenesztráció és a renin-angiotenzin rendszer (RAS)

Az afferens arteriola fenesztrációjának elhelyezkedése nem független a renin granulált sejtektől. Kísérleteinkben az afferens arteriola fenesztrált endothéllal borított szakaszának hossza és a renin-pozitív szakasz hossza között szigorú korrelációt találtunk. Másképpen fogalmazva fenesztráció ott alakul ki, ahol az ér falában renin termelődik. Ez az összefüggés olyan erős, hogy amennyiben a RAS aktivitását AT_1 receptor blokkolóval, vagy angiotenzin konvertáló enzim gátló (CEI) kezeléssel fokoztuk patkányokban, úgy nem csak a renin-pozitív szakasz nőtt szignifikánsan, de ferritin pozitív/permeabilis, azaz fenesztráltságot mutató szakasz is arányosan változott. Ezért joggal feltételezhetjük, hogy az emberben is pl. a

diabeteses állapotban, amikor nő a renin aktivitás, vagy hypertóniásokban, akiknek AT₁ vagy CEI blokkolót adunk terápiaként, változik az afferens arteriola szerkezete. Ez az átalakulás eddigi kísérleti eredményeink alapján feltételezhetően éppen úgy reverzibilis, mint ahogy a renin granulált szakasz is visszaalakulhat simaizomzatú szakasszá, vagy fordítva. Ismert, hogy újszülöttekben a renális arteriális rendszer fala szinte teljes hosszában renin pozitivitást mutat. Ezért vizsgáltuk újszülött patkányokban a ferritin permeabilitást, illetve a fenestráltságot. Azt találtuk, hogy ahol a teljes afferens arteriola renin-pozitív, ott az arteriola teljes hosszában ugyancsak kimutatható a fenestrációra jellemző fokozott endotheliális permeabilitás. A szülés utáni napok számának, azaz a kornak a növekedésével arányosan csökkent, mind a renin pozitív szakasz, mind a fenestráltságot mutató afferens arterioláris szakasz hossza. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a renin és a fenestráció megjelenése összefügg.

Az irodalomból ismert, hogy a renin az afferens arteriolából nemcsak az intersticiumba kerül, de bejut a keringő vérbe is. Ennek megfelelően az afferens arteriola vérének a renin koncentrációja alacsonyabb, mint az efferens arteriolában mért renin koncentráció érték. Eddig nehéz volt belátni, hogy a relatíve nagy méretű renin molekula (~40 kD), hogyan juthat át az arteriola falát befedő, zárt réteget képező endothélen keresztül. Eredményeink magyarázatot adhatnak erre a kérdésre, hiszen a fenestráció lehetőséget biztosít a renin keringésbe kerüléséhez. Ugyanakkor közvetlen kapcsolatot teremt a keringő plazma és a renin granulált sejtek felszíne között is. Tehát a renin szekréciót befolyásoló plazma összetevők a granulált sejtek membránjával érintkezve közvetlenül fejthetik ki hatásukat a szekréciójukra. A Bowman-tok parietális lemezén található és a renin granulált sejtek felé néző, illetve azokat borító filtrációs rések azt is lehetővé teszik, hogy a vizelet összetevők is közvetlen kapcsolatba kerüljenek a granulált sejtekkel. Hogy mindezeknek mi a további fiziológiai következménye, illetve a pathophysiológiai folyamatokban betöltött szerepe, az egyelőre nem világos. Ezekre a kérdésekre további vizsgálatoknak kell választ adniuk.

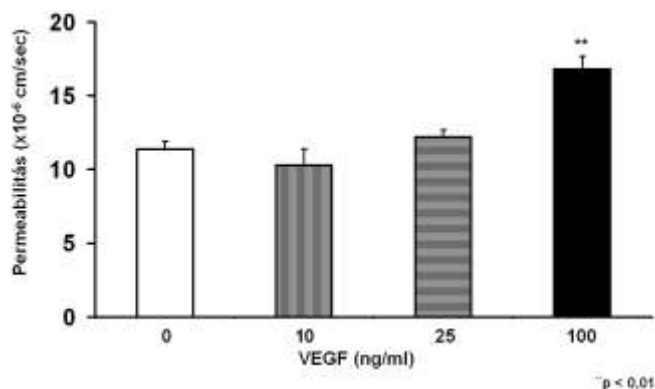
VI. A fenestrált endothélium permeabilitása

A fenestrumok működésének jellemzésére nemcsak a fenestrumok számának nyomon követése adhat felvilágosítást, de fontos lehet a fenestrumok permeabilitásának meghatározása, illetve változásának kimutatása is. Annak bizonyítására, hogy az afferens arteriola folyadék számára átjárhat nyomjelző dózisu neutralizált ferritin szemcséket használtunk. A ferritint az aortába adtuk és a veseszövetben elektron mikroszkóppal lokalizáltuk. Így sikerült korán kimutatnunk, hogy a fenestrált endothél nem csak morfológiailag tűnik filtrációs membránnak, de úgy is viselkedik. A permeabilitás pontos mértékét 40kD-os jelzett dextran molekula segítségével határoztuk meg HUVEC sejteken in vitro.

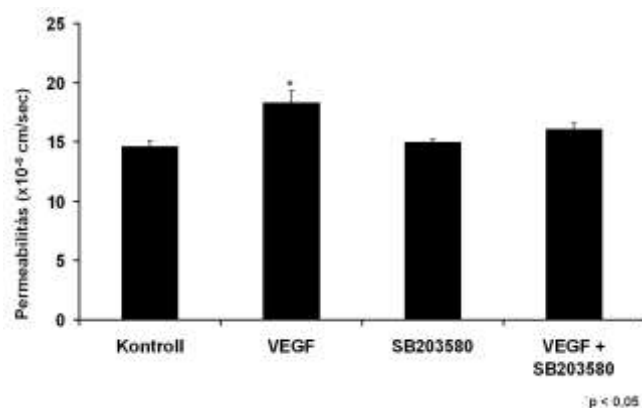
A VEGF és RAS hatása a transzendotheliális permeabilitásra in vitro sejtenyészetben

A VEGF megnövelte az endotheliális permeabilitást és ebben a p38 MAP kináz aktivációjának fontos szabályozó szerepe van. Az endothel sejteket konfluens állapotig tenyésztettük 0,4 µm porus méretű membránon. A kezelések előtt 10 mg/ml koncentrációjú 40 kD méretű FITC-dextránt tartalmazó fenolvörös mentes médium került a sejtekre. A kezelés megkezdése után 15 percenként mintát vettünk a sejtréteg alatt található médiumból és fluoreszcens plate reader-el megmértük a FITC tartalmát. Méréseink alapján a 100 ng/ml

dózisú VEGF kezelés már 15 perc után megnövelte a HUVEC monolayer permeabilitását a 40 kD méretű FITC-dextran-al szemben. Ha az endothel sejteket a VEGF kezelést megelőzően 30 percig előkezeltük a p38 MAP kinázt szelektíven gátló 10 μ M SB203580-al, azt tapasztaltuk, hogy az előkezelés kivédte a VEGF permeabilitást fokozó hatását. Eredményeink alapján a VEGF a p38 aktivációján keresztül szabályozza a permeabilitást.

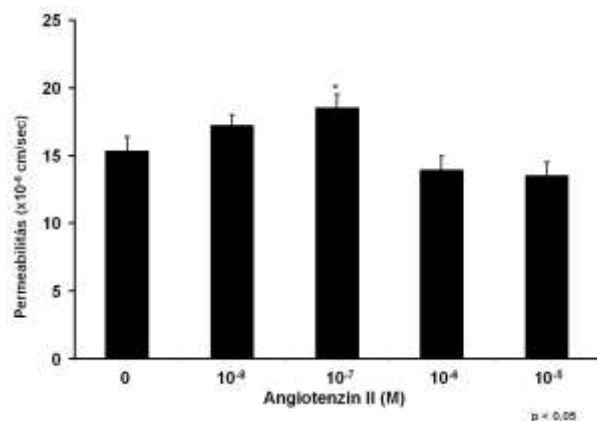


9. ábra. Különböző dózisú VEGF kezelés rövid távú hatása a konfluens HUVEC monolayer permeabilitására.



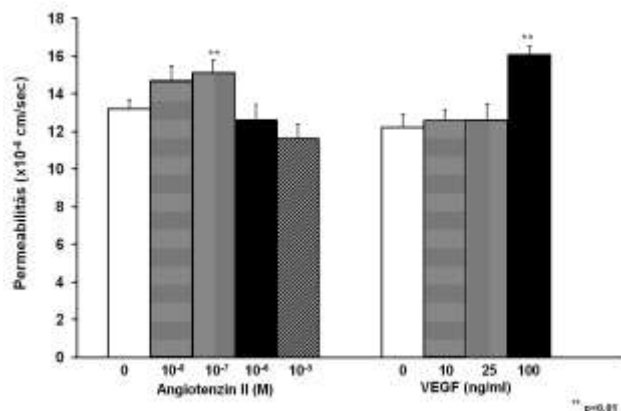
10. ábra. A p38 MAP kináz gátlásának hatása a VEGF-indukált permeabilitás növekedésre.

A 10^{-7} M Ang II kezelés 30 perc után permeabilitás növekedést okozott. Munkánk során 40 kD-os FITC-dextránnal megvizsgáltuk a konfluens endothel sejtréteg permeabilitását különböző dózisú angiotenzin II (Ang II) kezelést követően. Eredményeink alapján a 10^{-7} M Ang II 30 perc után megnövelte az endotheliális permeabilitást. Az ennél nagyobb, illetve a kisebb koncentrációtartományban csökkent a válasz intenzitása.



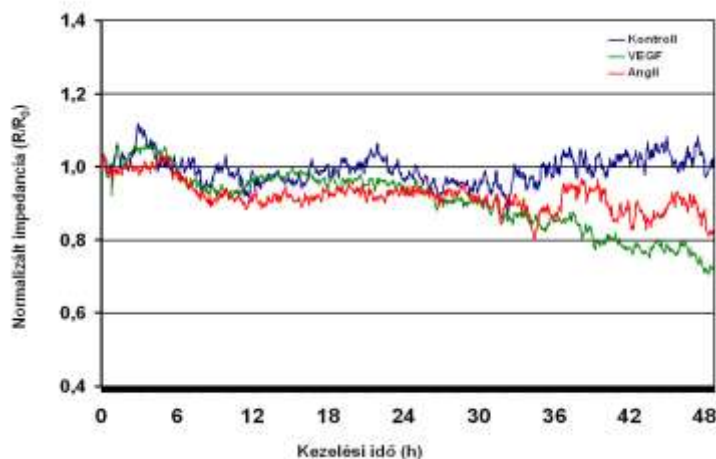
11. ábra. Különböző dózisú Ang II kezelés rövid távú hatása a konfluens HUVEC monolayer permeabilitására.

Megvizsgáltuk a 48 órás VEGF és Ang II kezelések hatását a 40 kD méretű FITC-dextránnal szembeni permeabilitásra és azt találtuk, hogy a 100 ng/ml VEGF és 10^{-7} M Ang II kezelések szignifikánsan megnövelték a permeabilitást a krónikus, hosszú távú kezelést követően is. Ebben az esetben is látható az angiotenzin hatás speciális dózis függése.



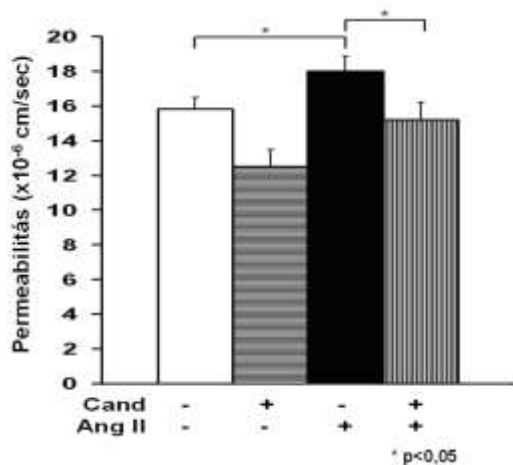
12. ábra. A permeabilitás változása 48 órán keresztül tartó VEGF és Ang II kezelések hatására.

Munkánk során jellemeztük a permeabilitás-változást a konfluens sejtréteg elektromos ellenállásának mérése alapján úgynevezett ECIS készülékkel. Ez a készülék a permeabilitás-változás valós idejű nyomon követését teszi lehetővé, továbbá sokkal érzékenyebb és reverzibilis változások is detektálhatóak. Eredményeink alátámasztják a korábbi FITC-dextrános permeabilitás méréseket, mivel mind a 100 ng/ml VEGF, mind a 10^{-7} M Ang II kezelés lecsökkentette a sejtréteg impedanciáját.

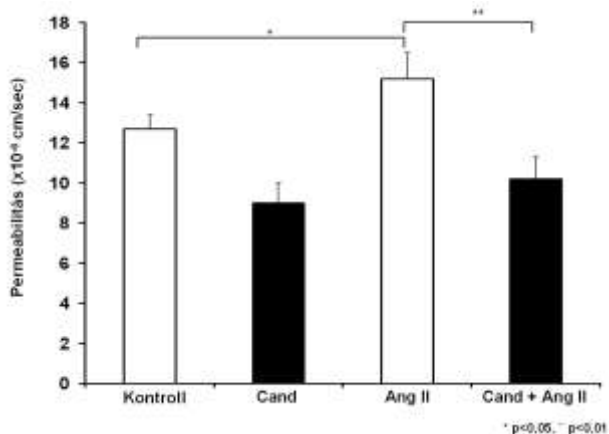


13. ábra. A konfluens HUVEC sejtréteg impedanciájának változása 48 órán keresztül tartó VEGF és Ang II kezelések hatására.

Az Ang II és a VEGF a permeabilitást fokozó hatását AT₁ és VEGFR-2 aktivációján keresztül hozta létre. Megvizsgáltuk, hogy az AT₁ receptornak mekkora szerepe van az Ang II által előidézett permeabilitás növekedésben. Vizsgálatainkhoz 10^{-5} M candesartan előkezelést használtunk és azt találtuk, hogy mind a rövid távú, mind a 48 órás vizsgálat során a receptor blokkoló meggátolta az Ang II kezelést követő permeabilitás fokozódást és ez a gátló hatás a 48 órás kezelés során erőteljesebb volt.

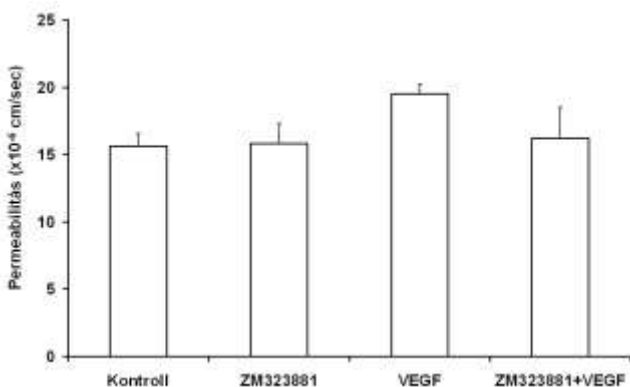


14. ábra. Az AT₁ receptort blokkoló candesartantan előkezelés hatása a 30 perces 10⁻⁷ M Ang II kezelés által megnövelt permeabilitásra.

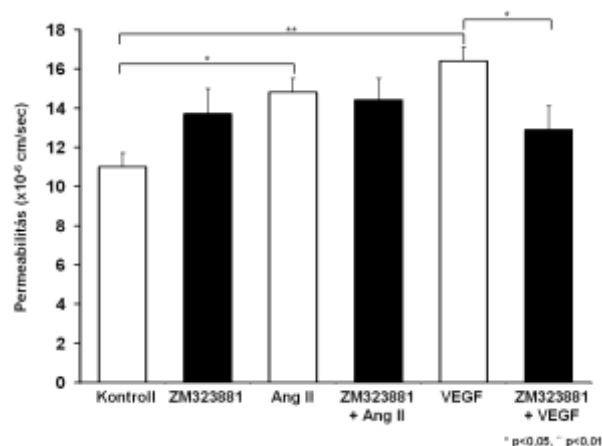


15. ábra. Az AT₁ receptor blokkolás hatása a 48 órás 10⁻⁷ M Ang II kezelés által megnövelt permeabilitásra.

Vizsgáltuk a VEGFR-2 receptor gátlásának hatását a VEGF-indukált permeabilitás növekedésre. A receptor blokkoló nem okozott szignifikáns csökkenést a rövid távú vizsgálatok során. Ennek oka lehet, hogy az általunk használt 50 nM ZM323881 blokkoló ebben a dózisban esetleg csak hosszú távon fejt ki számottevő blokkoló hatást. Ennél nagyobb dózis azonban 48 órás kísérletben befolyásolta a sejtek túlélését. Ugyanakkor ez a dózis a 48 óra VEGF kezelés után kialakuló permeabilitás növekedést szignifikánsan csökkentette.

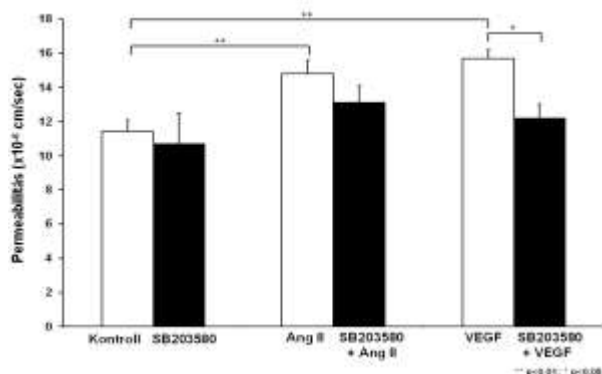


16. ábra. A VEGFR-2 receptort blokkoló ZM323881 előkezelés hatása a 15 perces 100 ng/ml VEGF kezelés által megnövelt permeabilitásra.

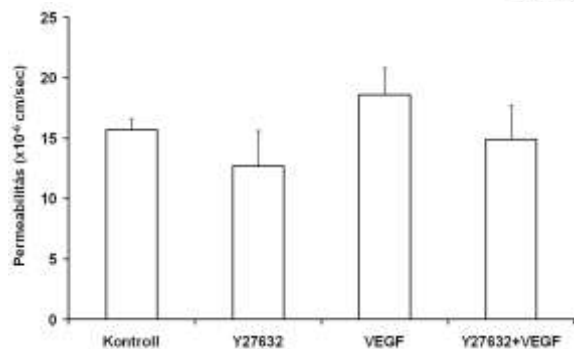


17. ábra. A VEGFR-2 receptort blokkoló ZM323881 előkezelés hatása a VEGF és Ang II által megnövelt permeabilitásra.

A p38 MAP kináz aktivációja szerepet játszik a 48 órás VEGF kezelés által indukált permeabilitás növekedésben. Megvizsgáltuk, hogy milyen jelátviteli utak játszhatnak szerepet a permeabilitás szabályozásában. Többek között vizsgáltuk a p38 MAP kináz aktivációjának szerepét az SB203580 gátlószer előkezelésével és a ROCK (Rho aktivált kináz) kináz szerepét az Y-26732 gátlószer segítségével. Előzetes eredményeink alapján a p38 szerepet játszik a hosszú távú VEGF kezelést követő permeabilitás növekedésben, míg az Ang II esetében nem találtunk szignifikáns eltérést. A ROCK kináz gátlása során is számszerűen csökkent a VEGF-indukált permeabilitás növekedés, de a csökkenés nem szignifikáns, feltételezhetően az előkísérletben szereplő alacsony esetszám miatt.



18. ábra. A p38 MAP kináz gátlás hatása az Ang II és VEGF által megnövelt permeabilitásra.



19. ábra. A ROCK kináz gátlás hatása a VEGF által megnövelt permeabilitásra.

VII. A fenesztrált endothélen keresztüli filtráció élő állatban történő kimutatása

Élő állat intakt nephronjában multiphoton lézermikroszkópia segítségével elsőként detektáltuk az afferens arteriola fenesztrált endothéljén keresztüli filtrációt és ezt összehasonlítottuk a glomeruláris filtráció értékével.

A intravénás LS bolus femorális vénába történő beadását követően a festék 5 s belül megjelenik az afferens arteriolában és a glomerulusban és azután a Bowman térbe és a korai proximális tubulusba filtrálódik. Az eseményeket videófilmen rögzítve követni tudtuk az LS festék fluorescens intenzitásának változását a JGA területén. Az LS afferens arteriolának a lumenben történő megjelenésével egyidőben LS fluoreszcencia jelent meg a JGA intersticiumban éppen úgy, mint az afferens arteriola körül. Az LS fluorescens „hullám” a JGA-ból minden irányban terjedt és 5 s belül a JGA intersticiumból kimosódott. A JGA intersticiumban található maximális fluorescens intenzitás közel 20%-a volt az afferens arteriolában található maximumnak ($17,9 \pm 3,5$). A fluorescens festék megoszlása a disztális afferens arteriola szakasz mentén az intersticiumban heterogén volt. A glomeruláris vaszkuláris pólushoz legközelebb eső részen mutatta a legnagyobb aktivitást, amíg a fluoreszcencia az afferens arteriola proximális szegmentje körül minimális volt. Az intenzív fluoreszcencia festődést mutató szegmentum hossza korrelált ($r = 0,85$, $n = 9$) a quinakrinnal jelzett renin pozitív szakasz hosszával.

Az LS-hoz hasonlóan a magas molekulású dextran-rodamin konjugátum a plazmából ugyancsak bekerült a JGA intersticiumba. Érdekes, hogy a dextran-rodamin fluorescens intenzitás a JGA-ban oszcilláló jellegű volt, hasonlóan a Bowman kapszulához. Az oszcilláció ugyanazt a fázist és ciklus időt mutatta mindkét helyen. Két komponensből állt: lassú (1/40-50s) és gyors (1/5-10s). Az LS bolus injekciót követően nemcsak a JGA intersticiumban jelent meg, de a macula densa tubuláris lumenében is. A festéknek e megjelenése specifikusan a macula densához kötődött. Nem volt látható a tubuláris áramlás irányával ellentétes irányban sem jelezve, hogy nem a glomeruláris filtrációból származik, azaz nem a proximális tubulus felől érkezik. A maximális LS intenzitás az MD lumenben 2-5 s-mal később jelent meg, mint az afferens arteriolában és a JGA-ban. A glomeruluson keresztül filtrált festék intratubuláris megjelenése sokkal később következett be (30-50s).

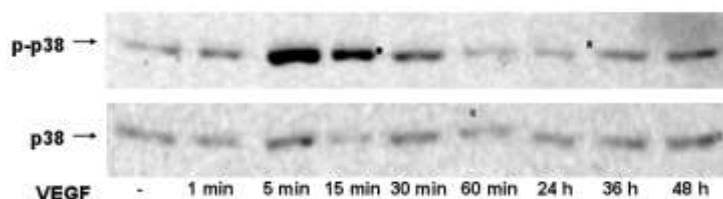
Élő állatban tehát sikerült vizualizálnunk és kvantifikálnunk az AA-ból a fenesztrált endothélen keresztüli filtrációt. Adataink szerint az afferens arteriolából kiáramló folyadék mennyiség a glomeruláris filtrátumnak mintegy 20%-a. Ugyancsak egyedülálló megfigyelés a juxtaglomeruláris apparátusból a macula densán keresztüli folyadék kiáramlás a tubulusba.

Izolált és perfundált patkány JGA preparátumon multiphoton lézer mikroszkópiával vizsgáltuk a MD területén történő folyadékáramlást úgy, hogy az afferens arteriolán keresztül perfúziós folyadékot infundáltunk a glomerulusba. A Bowman kapszulának megnöveltük a hidrosztatikus nyomását a proximális tubulus pipettával történő leszorításával, miközben az afferens arteriola perfúziót 50 Hgmm-en tartottuk. Jelentős volumennövekedést tapasztaltunk a Bowman kapszulában és a JGA intersticiumban. A MD sejtek volumene mintegy 60%-al nőtt ($62 \pm 4\%$ fluorescens fluo-4 vagy fura vörös alkalmazásakor). A MD sejt volumen növekedése mellett az extraglomeruláris mezangium és az MD intercelluláris oldalsó területe szintén jelentősen kitágult különösen az MD plakk közepén. Mindezek a változások reverzibilisek voltak. Ez a megfigyelés megerősítette a korábbi provokatív in vivo megfigyelésünket

miszerint a közismert macula densan keresztüli disztális tubuláris aktív ion-transzportot követő folyadékáramlás (a paracelluláris réseken a juxtaglomeruláris interstitiumba) mellett egy ellentétes folyadékmozgás is létezik.

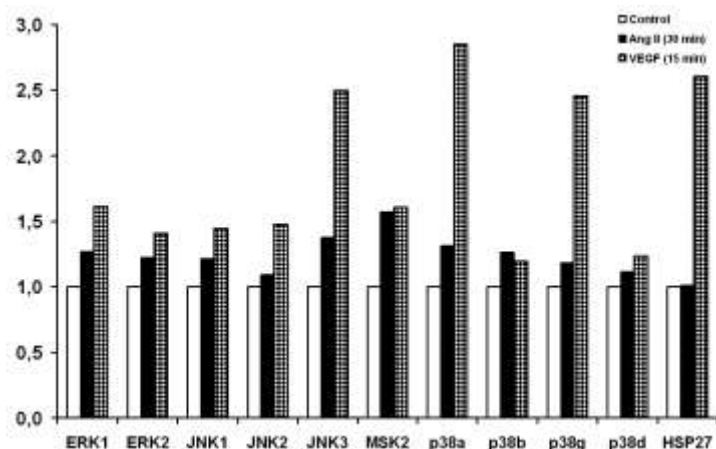
VIII. A VEGF által aktivált jelátviteli utak illetve morfológiai és funkcionális változások

A VEGF aktiválja a p38-at és ez az aktiváció 48 óra után is kimutatható. Western blottal vizsgáltuk a VEGF hatását a p38 aktivációjára. Kimutattuk, hogy a 100 ng/ml VEGF kezelés gyorsan, már 1 perc után aktiválja a p38 MAP kinázt és ez az aktiváció 5 perc után a legerőteljesebb, közel nyolcszoros, majd 60 percnél lecseng. Ugyanakkor 36 óra után újra fokozódik a p38 aktivációja, 48 óra kezelés után újra közel háromszoros.

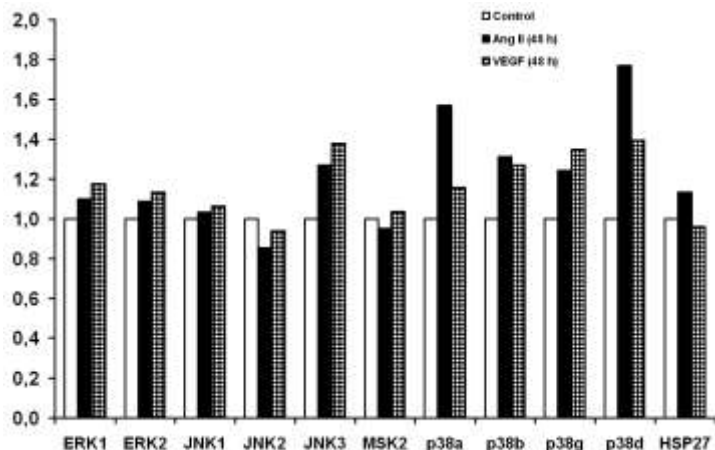


20. ábra. A VEGF idő függően aktiválta a p38 MAP kinázt.

MAP kináz array kísérletekkel kimutattuk, hogy a VEGF kezelés aktiválta mind az ERK, JNK és p38 útvonalakat, továbbá fokozta a HSP27 kis hősokk fehérje foszforilációját. Ezek közül 48 óra kezelés után a p38 és JNK3 aktivációja még kimutatható volt. Az Ang II is aktiválta a p38 és JNK3 útvonalat, amely 48 óra után is detektálható volt, sőt a p38 esetében még fokozódott. Továbbá mindkét citokin fokozta az MSK2 foszforilációját. Feltételezéseink szerint a HSP27 aktivációja felelős a stresszrostok kialakulásáért, míg az MSK2-ről leírták, hogy több transzkripciós faktor aktiválásában is szerepet játszik (ER81, ATF1, CREB).



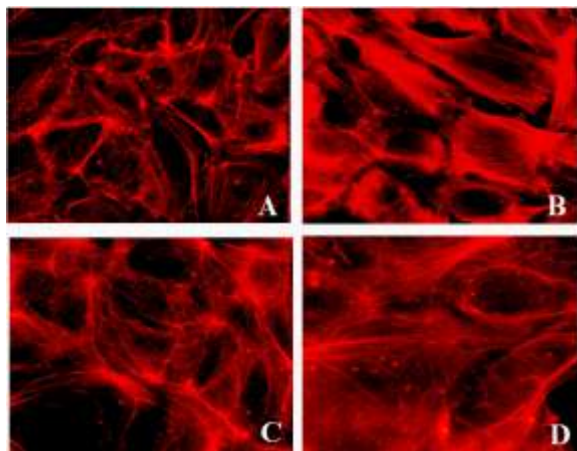
21. ábra. A rövid távú Ang II és VEGF kezelés hatása a MAPK útvonalak (ERK, p38, JNK) aktivációjára.



22. ábra. A hosszú távú Ang II és VEGF kezelés hatása a MAPK útvonalak (ERK, p38, JNK) aktivációjára.

IX. A VEGF stresszrost kialakulást idézett elő és fellazította a sejt-sejt kontaktusokat. A VEGF ezen hatásait a p38 MAP kináz aktivációja szabályozza

A vizsgálat során sejteket üveg fedőlemezen növesztettük a konfluens állapot eléréséig, majd VEGF-el kezeltük és bizonyos esetekben SB203580-al előkezeltük, majd rhodaminnal jelölt phalloidinnal festettük az aktin citoskeletonot. A 15 percig tartó 100 ng/ml dózisú VEGF kezelés hatására megváltozott az endothél sejtek aktin citoskeletonjának struktúrája. A nyugvó sejtekben inkább membránkörüli elhelyezkedésű aktin rostok szerkezete a kezelt sejtekben átrendeződött. A sejtek hossz tengelyével párhuzamos lefutású aktin stresszrostok jelentek meg a 15 perces VEGF kezelést követően. A 30 perces 10 μ M SB203580 előkezelésnek önmagában nem volt hatása az aktin struktúrára, ugyanakkor az előkezelt majd VEGF-el kezelt sejtekben az előkezelés következtében megmaradt a nyugvó sejtekre jellemző aktin struktúra, azaz elmaradt az aktin stresszrostok kialakulása.

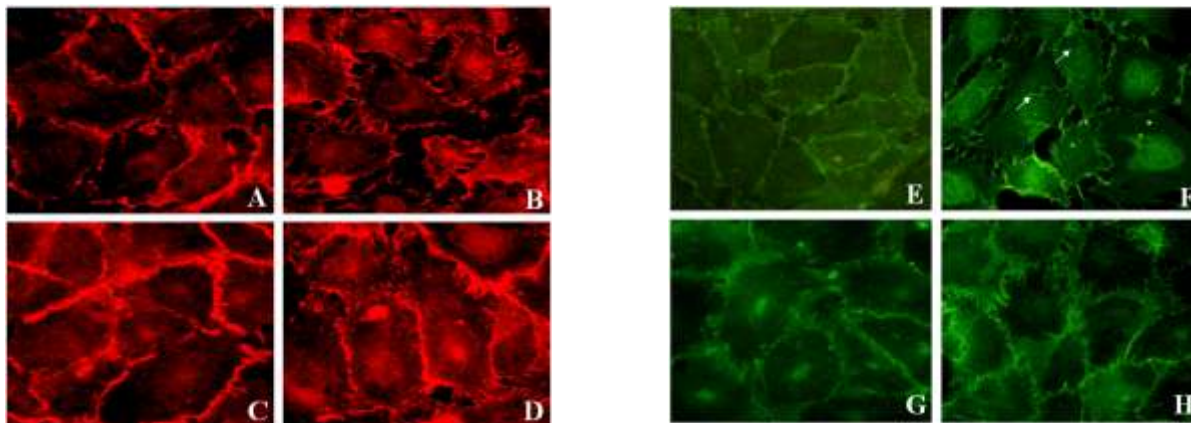


23. ábra. A VEGF kezelés hatása az aktin citoskeleton állapotára. A 15 percig tartó 100 ng/ml VEGF kezelés hatására aktin stresszrostok jelennek meg és ez a citoskeletonális átrendeződés sikeresen megelőzhető a p38 gátló SB203580 előkezelés segítségével. Kezeletlen, nyugvó sejtek (A), VEGF kezelt sejtek (B), SB203580 előkezelt sejtek (C), SB203580 előkezelt, majd VEGF kezelt sejtek (D).

A sejteket üveg fedőlemezen növesztettük a konfluens állapot eléréséig, majd VEGF-el kezeltük és bizonyos esetekben SB203580-al előkezeltük, majd specifikus antitestek segítségével festettük az adhézión kialakításáért felelős fehérjéket. A rövid távú VEGF kezelés hatására nem csupán a sejten belüli aktin citoskeleton, hanem a sejtek közötti adhézios kapcsolatok is átalakultak. Amíg konfluens állapotban a sejtek zárt monolayeret alkotnak, addig a kezelés hatására az adhézión fellazultak, a sejtek között lukák jelennek meg. Figyelemre

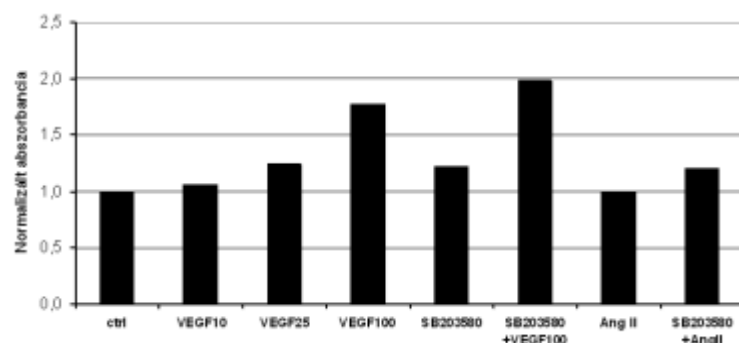
mélto, hogy az SB203580 előkezelte csoportokban mind a VE-cadherin, mind a β -catenin festés sokkal intenzívebb jelet adott a sejt-sejt kontaktusoknál, mint a kezeletlen csoportban. A 30 percen át tartó gátlószer előkezelés pedig az őt követő VEGF kezelés hatását jelentősen gátolta, a sejt-sejt kontaktusok fellazulása elmaradt, a monolayer zárt maradt. Eredményeink alapján a p38 gátlásával megelőzhető a VEGF kezelést követő stressz rost kialakulás és sejt-sejt kapcsolat fellazulás, valamint az ezzel egy időben kialakuló permeabilitás növekedés.

Stresszrost kialakulást okozott a tubuláris sejtek angiotenzinnel történő kezelése is, miközben fokozódott az epitheliális-mesenchymális tranzíció és megjelent az epithél sejtekben a mesenchymális markerként számon tartott α -simaizom aktin is.

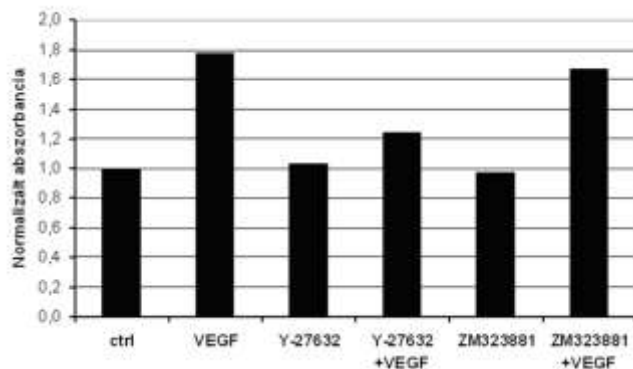


24. ábra. A VEGF kezelés hatására a sejt-sejt kapcsolatokra. A 15 percig tartó 100 ng/ml VEGF kezelés hatására a zárt endothél monolayer sejtei között rések keletkeztek, míg az SB203580 előkezelés megakadályozta a sejt-sejt kapcsolatok fellazulását. Kezeletlen, nyugvó sejtek (A;E), VEGF kezelt sejtek (B;F), SB203580 előkezelte sejtek (C;G), SB203580 előkezelte, majd VEGF kezelt sejtek (D;H). A képeken VE-cadherin (A-D) illetve a VE-cadherin intracelluláris részéhez kapcsolódó β -catenin (E-H) festés látható.

Annak tisztázására, hogy a különböző gátlószer előkezeléseket követő PV-1 mRNS csökkenés a gátlószerek specifikus hatása miatt alakult ki és nem a gátlószerek esetleges sejtpusztító hatása miatt, MTT proliferációs teszteket végeztünk. Eredményeik alapján a VEGF dóziszfüggően fokozta a HUVEC sejtek proliferációját, amire sem a ROCK, sem a VEGFR-2 gátlása nem volt negatív hatással. A p38-at gátló SB203580 még fokozta a sejtek túlélését, mind a VEGF, mind az Ang II kezelése során.



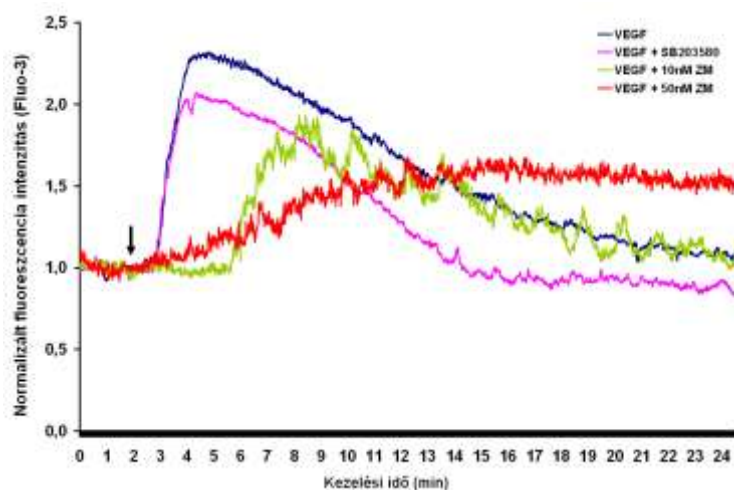
25. ábra. A VEGF és Ang II kezeléseket illetve az SB203580 előkezelés hatása a sejtek túlélésére.



26. ábra. A ZM323881 és Y-27632 gátlószerek előkezelések hatása a sejtek túlélésére.

A VEGF kezelés rövid időn belül megnövelte az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, a VEGFR-2 aktivációján keresztül.

Fluo-3-AM sejtp permeabilis fluoreszcens festék és laser scanning konfokális mikroszkóp felhasználásával megvizsgáltuk a VEGF kezelést követő intracelluláris Ca^{2+} -szint változást. Látható, hogy a VEGF kezelést követően egy percen belül kialakul a válasz, a kezelés több mint kétszeresére növelte az intracelluláris Ca^{2+} -szintet. A hatás kialakulásáért a VEGFR-2 a felelős.



27. ábra. A VEGF kezelés rövid időn belül megnövelte az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, amely a VEGFR-2 gátlásával kivédhető volt.

X. Összefoglalás

A filogenetikailag ősi képződmény, a juxtaglomeruláris apparátus, jelentős szerepet játszik a só-víz háztartás és a vérnyomás szabályozásában és számos betegség pathomechanizmusában. Ennek ellenére működésének számos részlete még tisztázatlan.

A juxtaglomeruláris apparátus sem nyirok-, sem vérkapillárisokat nem tartalmaz, ezért korábban feltételezték, hogy stabil intersticiális milieu-val rendelkezik, és így ideális közeget biztosít a macula densától az afferens arterioláig haladó humorális jelátvitelhez a tubuloglomeruláris feedback mechanizmus aktivációja során. E feltételezés cáfolatára

különböző modern funkcionális és morfológiai módszereket - a mikropunkciótól az atomerő mikroszkópiáig, a molekuláris biológiai mérésektől az in vivo multifoton lézermikroszkópos imaging technikáig - komplex módon alkalmazva vizsgáltuk a juxtaglomeruláris apparátus működését és szerkezetét in vitro és in vivo. Kimutattuk, hogy 1. az AA disztális szakaszát bélelő endothélium szokatlan módon fenesztrált, 2. a Bowman-kapszulának a renin tartalmú sejtek felé néző parietális epitheliális sejtjei filtrációs réseket képeznek, 3. a vizeletűr több helyen betüremkedik a juxtaglomeruláris intersticiumba úgy, hogy e zsákszerű képződményeket is filtrációs rések borítják. Igazoltuk, hogy az afferens arteriola fenesztráltsága nem korlátozódik egyetlen fajra; általános jelenség. Kísérletes emlőállatokon (patkány, mókuscickány, egér) kívül emberben, sőt amphiumában (gőtehal) is kimutattuk.

Az általunk leírt új szerkezeti sajátosságok alapján feltételeztük, hogy az eddigi elképzelésekkel ellentétben a juxtaglomeruláris apparátus nem zárt egységként viselkedik, hanem jelentős intersticiális folyadékmozgással rendelkezik.

Atomerő mikroszkópiával sikerült az. endothél sejtek plazmáján csatornaszerűen keresztül haladó, membránnal bélelt fenesztrumok részleteit és annak különböző beavatkozásokra történő számbeli és formai változásait láthatóvá tennünk. Megfigyeltük, hogy a fenesztrumok kissé felhányt széllel, a felszín felől szűkülő tölcser formájában jelennek meg. Átlagos átmérőjük mintegy 60-200 nm. Ez az adat jó egyezést mutat az elektronmikroszkópos technikával mért átmérővel.

Az afferens arteriola fenesztrációjának elhelyezkedése nem független a renin tartalmú sejtektől. Az afferens arteriola fenesztrált endothéllal borított szakaszának hossza és a renin-pozitív szakaszának hossza között szoros pozitív korrelációt találtunk mind in vitro, mind pedig in vivo mérésekkel.

Amennyiben a renin-angiotenzin rendszer aktivitását AT_1 receptor blokkolóval vagy konvertáló enzim gátló kezeléssel fokoztuk, úgy nemcsak a renin-pozitív szakasz, de a ferritin-pozitív/fenesztrált/permeabilis szakasz hossza is arányosan változott.

Újszülött patkányban, ahol a renális arteriális rendszer fala szinte teljes hosszában renin pozitivitást mutat, ugyancsak kimutatható volt a fenesztrációra jellemző fokozott endotheliális permeabilitás. A születés után mind a renin-pozitív szakasz, mind a fenesztráltságot mutató afferens arterioláris szakasz napról-napra csökkent.

Élő állatban is sikerült láthatóvá tennünk az elektronmikroszkópos vizsgálat alapján korábban leírt mikromorfológiai sajátosságokat. Az in vivo megfigyelések és funkcionális méréseink megerősítik, hogy a preglomeruláris arteriola felépítését és funkcióját tekintve nem egységes ér. Az afferens arteriola két szakaszból áll: 1. a disztális rész, mely renint nem tartalmaz, lumenét zárt endothélium borítja és falában erőteljes miozin pozitivitás mutatható ki, 2. a proximális rész, melynek fala renin-pozitív, miozin-negatív és az üregét fedő endothélium fenesztrált. Az utóbbi szakasz igen permeabilis, így az arteriolából a nyomáskülönbségnek megfelelően folyadék kerül a juxtaglomeruláris apparátus intersticiumba, amely nemcsak a tubuloglomeruláris feedback mechanizmust és a glomeruláris filtrációt, hanem a renin háztartást is befolyásolja.

Az afferens arteriola fenesztrációjával magyarázatot adtunk arra is, hogy a renin hogyan szekretálódhat az intersticiumból az afferens arteriola lumenébe. A renin tartalmú sejtekről kimutattuk, hogy egyik oldalról Bowman-tok parietális lemezén található filtrációs réseken

keresztül közvetlen kapcsolatba kerülnek a vizelet ürrel, az arteriola lumenális felszínén található endotheliális nanocsatornákon keresztül pedig a keringő plazmával. A nyomásviszonyok és folyadék mozgások iránya arra utal, hogy a JGA intersticiumába is jelentős mennyiségű renin kerülhet.

Igazoltuk, hogy az afferens arteriolában áramló plazma egy része nem kerül a glomerulusba, hanem az intersticiumba filtrálódik a renin-pozitív AA szakasz fenesztrált endotheliumán keresztül. A JGA intersticiumban található legnagyobb fluorescens intenzitás közel 20%-a volt az afferens arteriola üregében mért maximumnak.

A JGA területén a folyadékmozgás dinamikus és a JGA funkciójának és az aktuális hemodinamikai történéseknek megfelelően változik. A JGA-ba három helyről kerülhet folyadék: 1. az afferens arteriolából, 2. az extraglomeruláris mezangiumba türemkedő Bowman-kapszulából, 3. a peritubuláris kapillárisokból. A döntő az afferens arteriolából történő filtráció.

Az arterioláris filtráció intenzitása szoros korrelációt mutatott a quinakrinnal jelzett renin-pozitív szakasz hosszával élő állapotban is. A fenesztrumok átmérője in vivo mintegy 20%-kal nagyobbaknak adódtak.

A filtráció követésére használt festék injekcióját követően a fluorescencia nemcsak a JGA intersticiumban vált láthatóvá, de a macula densát tartalmazó tubulus szakasz lumenében is, messze megelőzve a glomeruláris filtráció következményeként a disztális tubulusba érkező festék megjelenését. Izolált perfundált JGA-preparátumban a proximális tubulus leszorítását követően pedig jelentős és reverzibilis volumennövekedés jött létre a Bowman-kapszulában, a JGA intersticiumban és a macula densában. A macula densa sejtek térfogata mintegy 60%-kal nőtt. Sikerült igazolnunk tehát, hogy a JGA intersticiumból folyadék áramlik a macula densa tubuláris szakaszának lumenébe.

Végezetül a juxtaglomeruláris apparátus új morfológiai és funkcionális adatai alapján leírtuk az új glomeruláris filtrációt szabályozó short loop (vaszkulo-vaszkuláris, feed forward) mechanizmust.

A kutatásaink során olyan új vese morfológiai és funkcionális jellegzetességeket tártunk fel, új szabályozási mechanizmusokat irtunk le, illetve javasoltunk, melyek számos további kérdést vetnek fel és új kutatási irányt jelölnek ki.